

ラット膝関節の発生学的研究

—光学及び電子顕微鏡による関節腔と十字靭帯の形成メカニズムに関する細胞生物学的研究—

金沢大学大学院医学研究科脳医科学専攻神経分布路形態・形成学
(旧講座名：第二解剖学)
(主任：田中重徳教授)

伊 藤 正 明

関節の滑膜形成におけるアポトーシス (apoptosis) の関与と細胞の分化過程を明らかにするために、光学及び電子顕微鏡、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) 法とDNAの電気泳動を用いて、ラット膝関節の形成を詳細に調べた。関節腔の形成は2つの骨原基の介在領域 (interzone, IZ) の間葉性細胞凝集塊の中心に位置する中間帯 (intermediate zone, IMZ) でなされるが、細胞死とりわけアポトーシスと関係する所見は観察したすべての胎生期において認められなかった。細胞分化に伴う形態学的変化に関しては、IMZの扁平な細胞の一部において、細胞質が空胞化し、核が濃染し、数層に平行に配列しているのが観察された。これらの細胞の幾つかはさらに伸張・扁平化して紡錘形細胞 (spindle cell) となり、ほぼ2層の層状構造となっていた。残りの細胞はやや扁平な軟骨芽細胞となり、二次的に外層に組み込まれた。コラーゲン線維は外層で網状に配列し、IMZでは細胞に平行に配列されていた。コラーゲン線維の密度はIMZでは低かった。関節腔は、パラフィン切片ではE16.5において扁平化した細胞の間で、樹脂切片ではE18において紡錘形細胞の間で形成されているのが確認された。この紡錘形細胞は半月板と関節軟骨の表面に配列し、その後において軟骨細胞に分化した。関節腔の形成はプロテオグリカン及びコラーゲン線維の減少、そしてヒアルロン酸の産生による細胞間結合の喪失によるものと推測される。IZの微細な細胞変化はコラーゲン線維の配列と密度の違い、層間の細胞外基質の状態を示しており、関節腔形成は紡錘形細胞間でなされるものと推測される。膝関節の重要構造物である膝前十字靭帯の脛骨側付着部の発生過程においては、軟骨膜は形成されず、発生途上の関節腔の境界を示す紡錘形細胞の層構造は観察されなかった。一方、靭帯に沿ったコラーゲン線維束の軟骨内での発達と円形細胞の柱状配列の段階的变化が観察された。前十字靭帯脛骨側付着部におけるコラーゲン線維の発達はシャープー線維の発達とは異なると考えられる。

Key words apoptosis, cavitation, crucial ligament, genu joint, rat embryo

滑膜性関節の形成初期において、2つの骨原基間領域 (interzone, IZ) 間葉性細胞が凝集することが報告されており^{1)~11)}、この細胞凝集のなかに滑膜性関節は形成されると言われている。IZの細胞凝集塊には3層構造が認められ、中心をなす中間帯 (intermediate zone, IMZ) と、IMZを挟む2つの外層 (outer layer) とからなる^{8)~11)}。

滑膜性関節における関節腔の形成メカニズムに関する説は2つに大別される。一つはIZの一部分に初期関節腔が形成され、関節運動の機械的刺激によって関節腔が拡大されていくという説であり^{1)10)11)~16)}、もう一つはIZの細胞が細胞死によって消失することによって関節腔が形成されていくという説である^{9)12)17)~19)}。前者は古くから広く受け入れられて来っており、これを支持するニワトリ胚を用いた発生学的研究において、機械的刺激が欠如した場合に関節の癒着が起こることが報告されている⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。さらに、myogenin 遺伝子に突然変異のあるマウス

では筋が形成されず、関節運動による機械的刺激のかわりに母体が動くことによる受動的な関節への機械的刺激が関節腔の形成を誘導すると考えられている²⁰⁾。しかしながら、これらの機械的刺激は関節腔の形成において、必ずしも重要ではないという見解がある。Andersonら¹⁰⁾によると、関節腔の形成に先立ち、IZにコンドロイチン硫酸AおよびCの集積が認められるという。さらに、Andersonら¹⁰⁾はこれらの物質が細胞間基質に蓄積することが関節腔の形成に重要であると述べている。後者のIZにおける細胞死によって関節腔が形成されるという説は、指趾や²¹⁾²²⁾、中枢神経系²³⁾、口蓋²⁴⁾などの形成に関する所見から類推されたものであって、関節腔の形成時における細胞死の全過程は未だに明らかになっていない。

いずれにしても、これらの2説に関しては裏付けとなる決定的な所見が報告されていない²⁵⁾。その一方において、近年の発生生物学及び分子生物学の進歩により、形態形成過程の細胞死

平成14年11月21日受付、平成14年12月25日受理

Abbreviations: HAS, hyaluronan synthase; IMZ, intermediate zone; IZ, interzone; UDOGD, uridine diphosphoglucose dehydrogenase.

においてアポトーシスが果たす重要な役割が明らかとなった。アポトーシスは軟骨形成を抑制することが報告されており²⁶⁾、それゆえアポトーシスの関節形成、とりわけ関節腔の形成への関与の有無を明確にすることは重要課題である。本研究ではラット胎仔を試料として用い、滑膜性関節の関節腔の形成過程を光学ならびに電子顕微鏡により形態学的に精査することを試みた。同時に、TUNEL法ならびにアガロースゲル電気泳動法によるDNA解析を行い、関節腔の形成過程におけるアポトーシスの発現の有無を調べた。更には膝関節全体の形成機序を明らかにするために、前十字靱帯の脛骨付着部 (enthesis、以下 靱帯付着部) にも焦点を当て、光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて形成過程を観察した。

対象および方法

I. 対象

関節腔の形成過程に関しては、Wister系ラットの胎仔、胎生14日から生後1日まで (E14, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, P1) の膝関節126側を使用した。さらに、アポトーシスの解析における対照群として前肢12側を使用した。ラットは雌雄各1頭ずつを同一ケージで一晩飼育したのち、翌朝膣口スメアを採取し、精子が確認されたときを胎生0日 (E0) とした。

靱帯と靱帯付着部の形成過程に関しては、E17からP30まで (E17, E18, E18.5, E19, P1, P2, P6, P30) のラット胎仔の膝関節27側を使用した。

II. 方法

1. 関節腔の形成

1) 光学顕微鏡による観察

光学顕微鏡観察には、パラフィン包埋切片とエポキシ樹脂包埋切片を用いた。パラフィン包埋用の膝関節標本は、4%パラフォルムアルデヒド液にて室温で一晩固定したのち、エタノール系列により脱水し、パラフィン包埋した。4~6 μ m厚の矢状断および前額断連続切片を作製し、HE染色ならびにアザン染色を行った。エポキシ樹脂包埋用の膝関節標本は、2.5%グルタルアルデヒド/2%パラフォルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 (pH 7.2) で一晩固定したのち、4%スクロース含有リン酸緩衝液 (pH 7.2) にて洗浄した。1%四酸化オスミウム溶液で後固定 (室温, 2時間) を行いエポキシ樹脂 (NSA, Quetall-653, ERL-4206 and S-1; TAAB, Berks, England²⁷⁾) にて包埋した。2 μ m厚の連続切片を作製し、トルイジンブルーにて染色・観察を行った。

2) 透過型電子顕微鏡による観察

上記と同様のエポキシ樹脂包埋標本を用いて、厚さ50nmの薄切切片を作製し、透過型電子顕微鏡H-300 (日立製作所, 東京) にて観察した。

3) TUNEL法によるアポトーシスの解析

E16からE18.5までの膝関節12側において、アポトーシスの有無を解析するために、TUNEL法 (in situ apoptosis detection kit, Trevigen, MD, USA) を Gavrieli ら²⁸⁾の方法に従って行った。

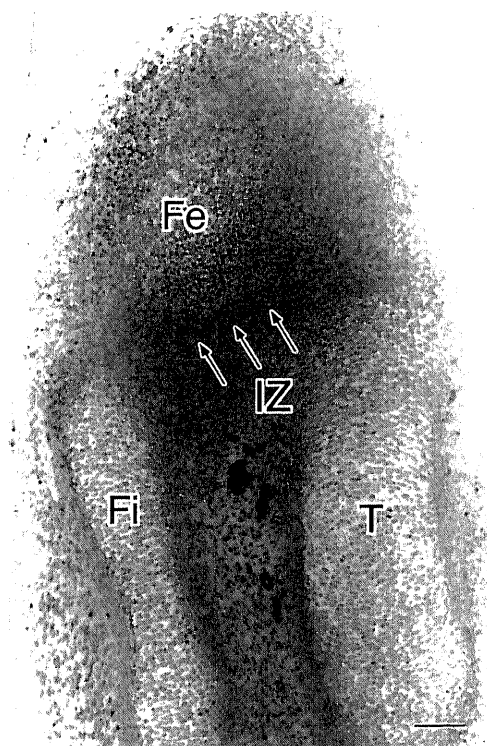


Fig. 1. Coronal section of an epoxy sample showing the assumptive knee joint at E15. In the joint region, dense accumulation of the mesenchymal cells was observed (IZ, arrows). Chondrification has already occurred in the diaphysis of Fe, Fi and T. Toluidine blue staining. Bar, 100 μ m.

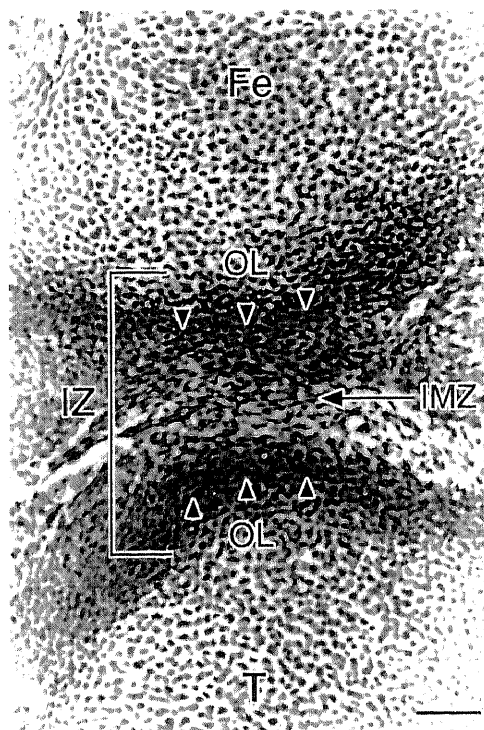


Fig. 2. Sagittal paraffin section indicating IZ at E16. This sectioning was performed at the mid-sagittal plain of the femorotibial joint. IZ consists of three layers: two outer layers (OL, arrowheads) and the intermediate zone between these two layers (IMZ, arrow). The cell density of IMZ is lower than those of OL, and cells are slightly elongated in IMZ. Azan staining. Bar, 100 μ m.

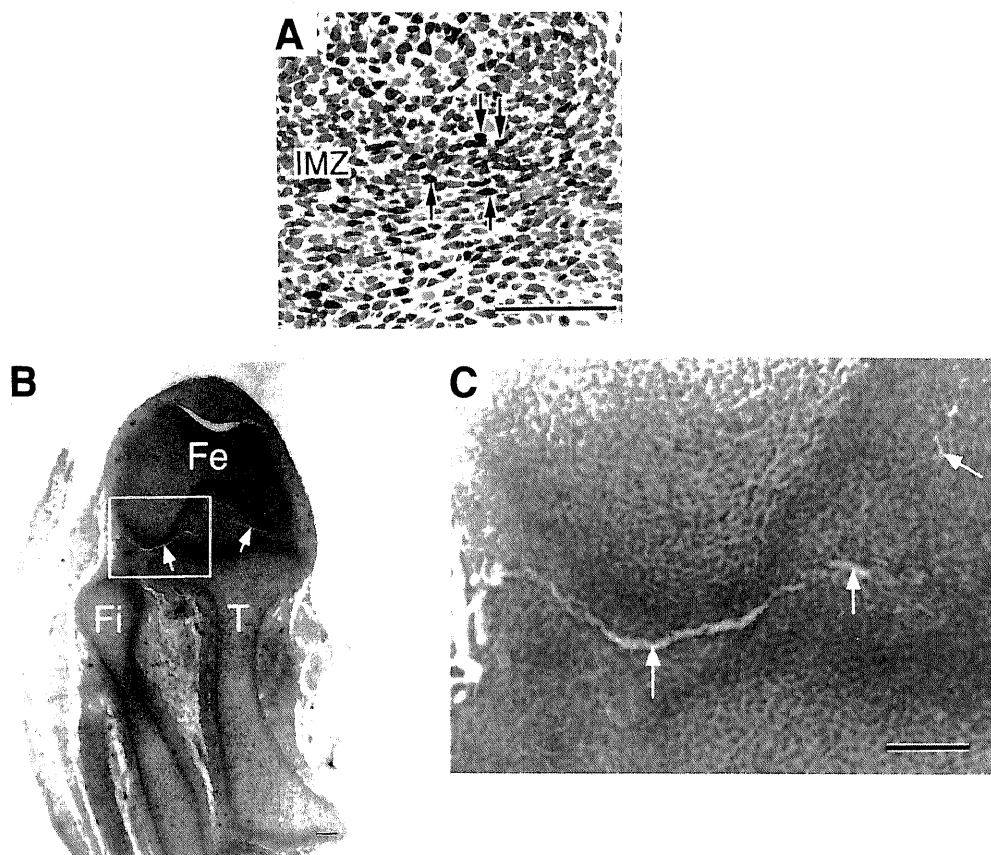


Fig. 3. Photographs at E16.5. (A) A sagittal epoxy section showing the initial appearance of dark cells (arrows) in IMZ. Moderately elongated cells are arranged in some strata of the intermediate zone (four or less), and no cavitation is observed. Toluidine blue staining. Bar, $100\mu\text{m}$. (B) A coronal paraffin section indicating partial cavitation (arrows) in the knee joint. HE staining. Bar, $100\mu\text{m}$. (C) A highly magnified picture of the white box in (B). The cavity (arrows) seemed to be irregular in shape. In addition, some cells remain in the cavity. Bar, $100\mu\text{m}$.

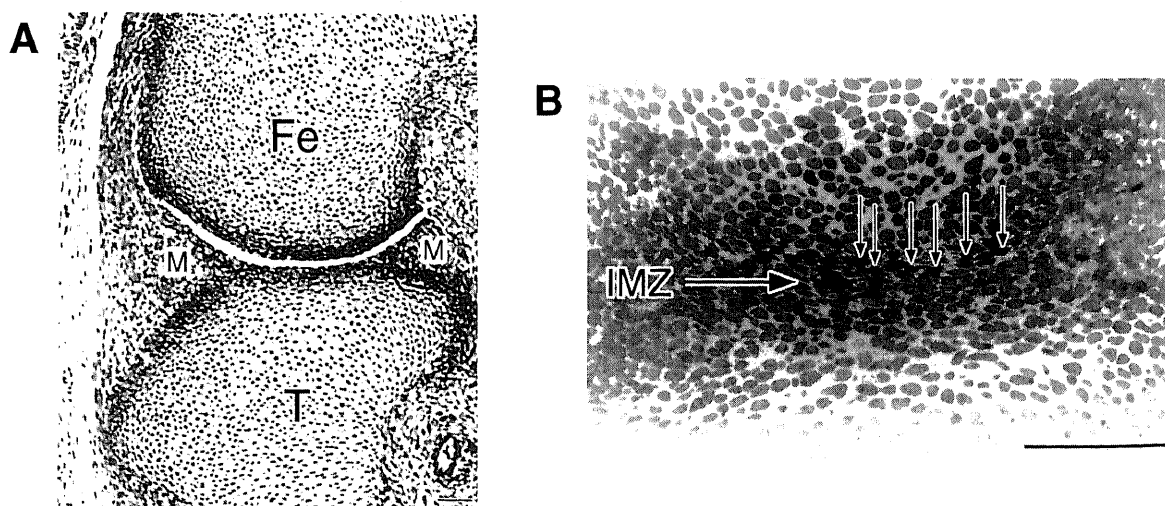


Fig. 4. Photographs of sagittal paraffin and epoxy sections at E17. (A) Cavitation has apparently occurred in the medial femorotibial joint between Fe and M. On the other hand, the cavitation between T and M has not appeared yet. A paraffin section with azan staining. Bar, $100\mu\text{m}$. (B) Moderately elongated cells are more flattened in IMZ, and the number of the dark cells increases (arrows). An epoxy section with toluidine blue staining. Bar, $100\mu\text{m}$.

6 μ m厚の連続切片を作製し、脱パラフィン後、PBSで10分間洗浄し、プロテアーゼ K による処理を15分間行った。内因性ペルオキシダーゼをブロックするために切片を、3%過酸化水素水で5分間処理し、リン酸緩衝液 (pH7.2) で1分間洗浄した後、TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 溶液を加え37℃、1時間インキュベーションした。これを、ストレプトリジン-ペルオキシダーゼ溶液で10分間インキュベーションした後、ジアミノベンチジンで室温5分間処理した。対比染色としてメチルグリーンを用いた。さらに本研究では、対照群としてアポトーシスの存在がすでに確認されている前肢指間部²⁴⁾²⁹⁾³⁰⁾においてTUNEL法でアポトーシスの解析を行った。

4) 電気泳動法によるアポトーシスの解析

E16, 17, 18, 18.5における膝関節 (各3側、合計12側) を用いて、QIAamp Tissue Kit (Qiagen, CA, USA) にてDNAを抽出した。DNA抽出溶液10 μ lにloading溶液2 μ lを加え、アガロースゲルにて電気泳動を行った。泳動用緩衝液には2% TAE (Tris-acetate, EDTA, pH8.0) 緩衝液を用いた。泳動後、アガロースゲルをSYBRGreen I (Molecular Probes, Eugene, USA) で染色したのち、FluorImager SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) にて撮影した。対照群としてE16の前肢12側においても、同様にアガロースゲル電気泳動によるDNA断片化の解析を行った。

2. 靱帯と靱帯付着部の形成

エポキシ樹脂で包埋し、2 μ mの連続切片を作製し、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

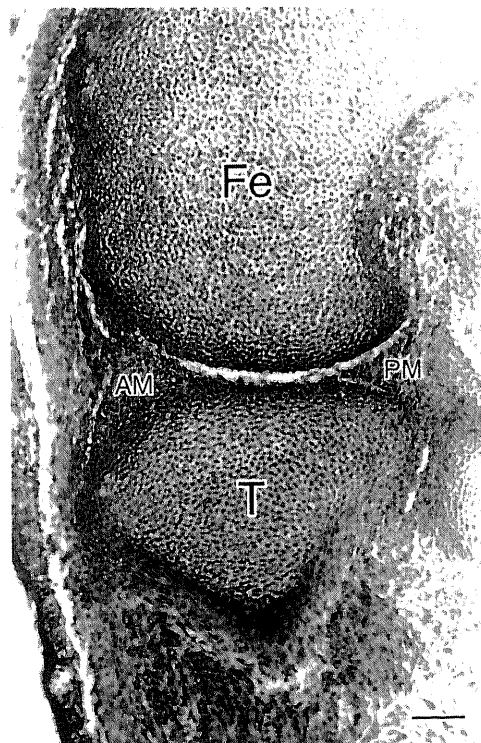


Fig. 5. Progress of cavitation in a paraffin section at E17.5. Cavitation has advanced at the femoromeniscal, and has started between T and PM in the sagittal section. Azan staining. Bar, 100 μ m.

成 績

1. 関節腔の形成

1) 光学顕微鏡所見

膝関節のパラフィン包埋切片ならびにエポキシ樹脂包埋切片の、光学顕微鏡による各ステージ (E14, 15, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, P1) における観察結果は以下の通りであった。

E14: 骨形成予定領域と推定される部位において、不整型の未分化間葉細胞の凝集が認められた。しかしながら、当該部位における軟骨形成は未だ認められなかった。

E15: 大腿骨、脛骨、腓骨の各原基が明瞭となり、骨幹部においては軟骨形成が開始していた。一方、骨端部においては、依然として未分化間葉細胞が凝集しており、関節構造を確認することはできなかった (図1)。

E16: 大腿骨および脛骨の原基において、軟骨形成が骨端にまで及んでいた。これらの両骨原基間で、膝関節形成予定領域の間葉細胞凝集塊において、IZの形成が確認された (図2)。図2

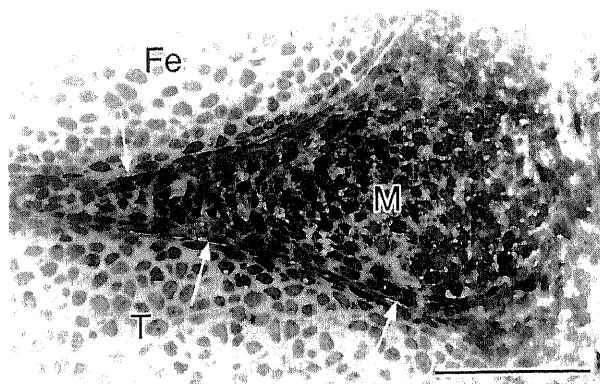


Fig. 6. A coronal epoxy section at E18.5. Cavitation (arrows) has started in the peripheral part of IMZ both between Fe and M, and between T and M. Toluidine blue staining. Bar, 100 μ m.

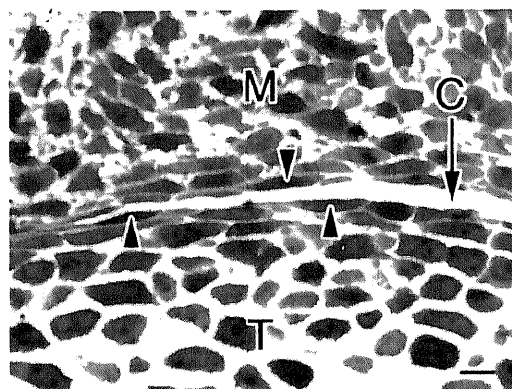


Fig. 7. Coronal epoxy section at E19. Spindle cells (arrows) are arranged on both surfaces of the epiphysis and meniscus. The epiphyseal surface, including spindle cells, morphologically seems to correspond to the adult tangential zone. Toluidine blue staining. Bar, 100 μ m.

に示すように、IZには三層構造が認められ、中間層をなすIMZと、IMZと大腿骨および脛骨原基それぞれとのあいだに存在する2層の外層から構成されていた。IMZにおいては細胞密度が低く、伸張した扁平な細胞 (elongated cell) が観察された。IMZ

は非常に薄い層ではあるが、最も薄い中央部においても、5層以上の細胞層が認められた。外層は細胞密度が高く、楕円形の細胞が多数観察された。

E16.5 : E16においてIMZで認められた扁平な細胞は、さら

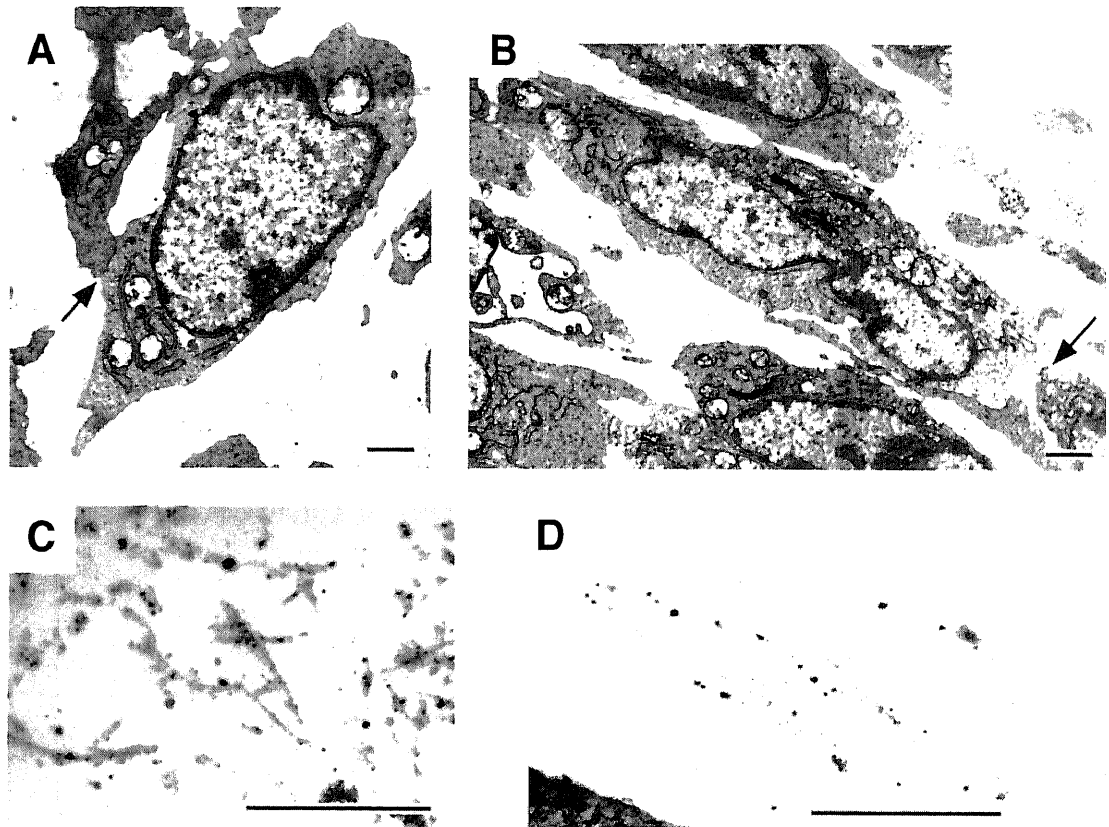


Fig. 8. Electron micrographs indicating cell structures and collagen fibers in the IZ at E16.5. (A) A high power micrograph of a rounded cell in OL. The rER is scarcely furnished and there are observed dilated mitochondria with poorly developed cristae. The arrow indicates the site of cell to cell interaction. Bar, $1\mu\text{m}$. (B) A high power micrograph of moderately elongated cells in IMZ. Developmental condition of cell organelles are similar to those of the rounded cells in the outer layers. Elongated cells in IMZ also have projections for cell interaction with each other (arrow). Bar, $1\mu\text{m}$. (C) Collagen fibers in OL are arranged in a netted form, although their density remains moderately. Bar, $1\mu\text{m}$. (D) Collagen fibers in IMZ are likely arranged parallel to a long axis of elongated cells with a lower density than those in outer layer. Bar, $1\mu\text{m}$.

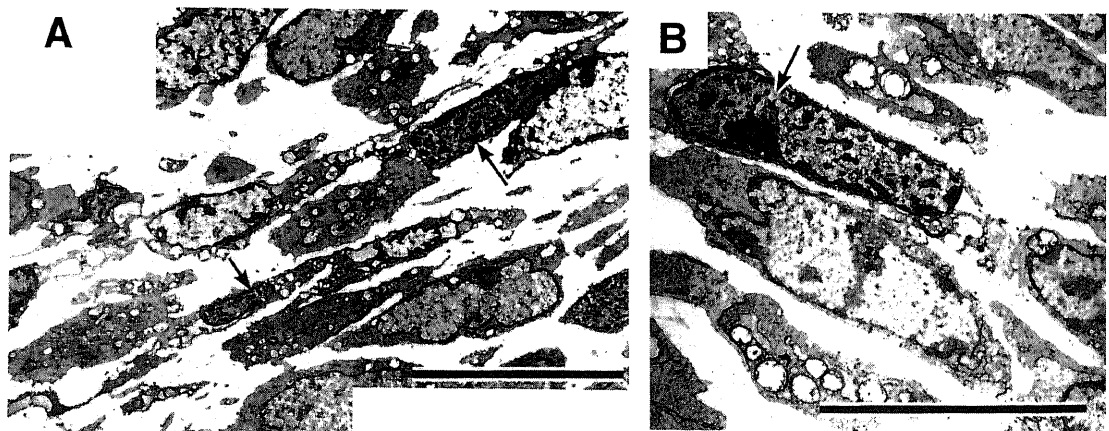


Fig. 9. Photomicrographs indicating pyknosis in elongated cells at E17. These cells do not show any signs of cell death except for pyknosis and vacuolization. (A) Pyknosis advances to a high degree in some elongated cells (arrows). Bar, $10\mu\text{m}$. (B) Moderately advanced pyknosis in the elongated cell (arrow). Bar, $10\mu\text{m}$.

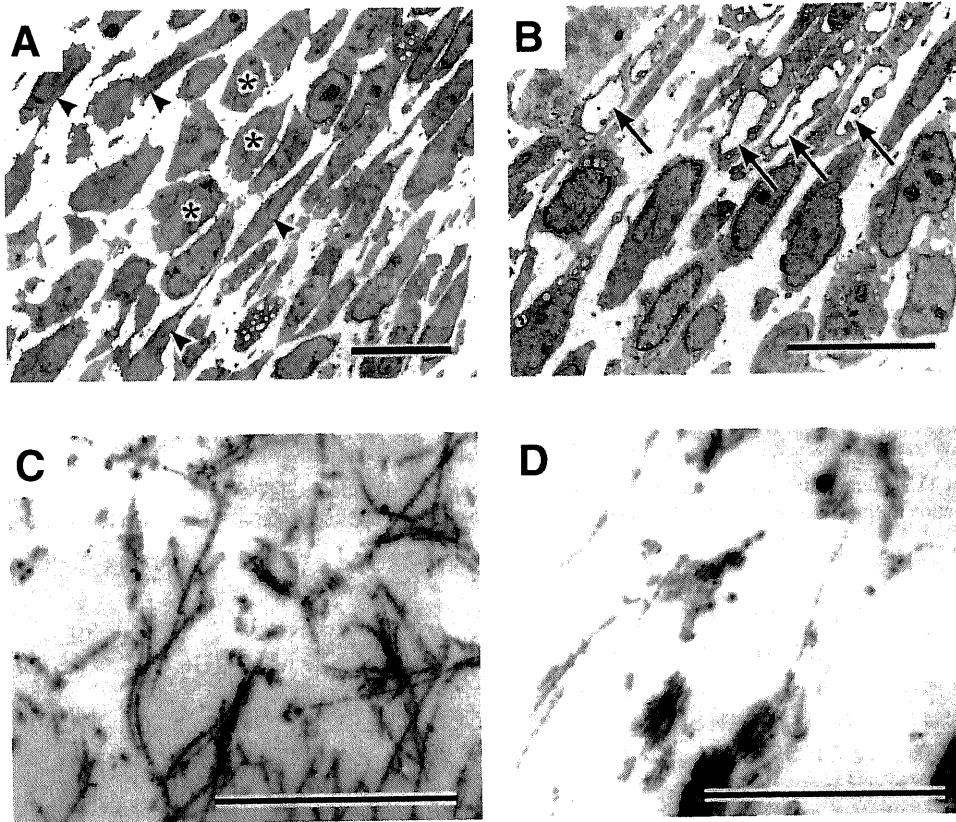


Fig. 10. E17.5. (A) Electron micrographs of the outer layer. In the layer, elongated cells (arrowheads) are intermingled with cells similar to chondroblasts in short or round in shape (asterisks). Bar, $10\mu\text{m}$. (B) Vacuolization (arrows) advances in the highly elongated cells in IMZ. Bar, $10\mu\text{m}$. (C) Collagen fibers in OL are increased in number and netted distribution is more clearly recognized than in the stage of E16.5. Bar, $1\mu\text{m}$. (D) The arrangement of collagen fibers in IMZ is clearly different from that in the outer layers. The density is apparently low and the collagenous networks are not obviously discernible. Bar, $1\mu\text{m}$.

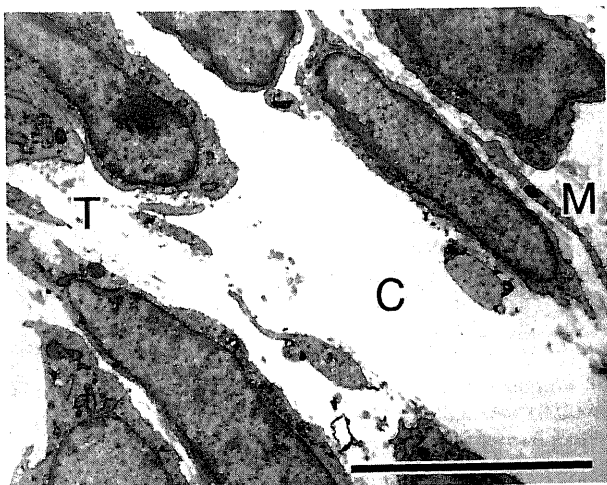


Fig. 11. An electron micrograph showing the area of cavitation at E18.5. The cavitation occurs between T and M. The extracellular matrix bordering the cavity has not yet developed. Vacuolization cannot be found. Bar, $10\mu\text{m}$.

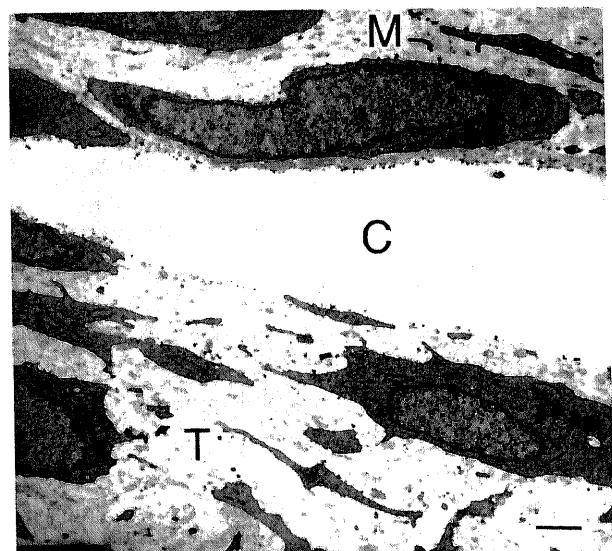


Fig. 12. Completion of the cavity in an epoxy section at E19 between T and M. The matrix has developed, and collagen fibers run just beneath the joint surface. Bar, $10\mu\text{m}$.

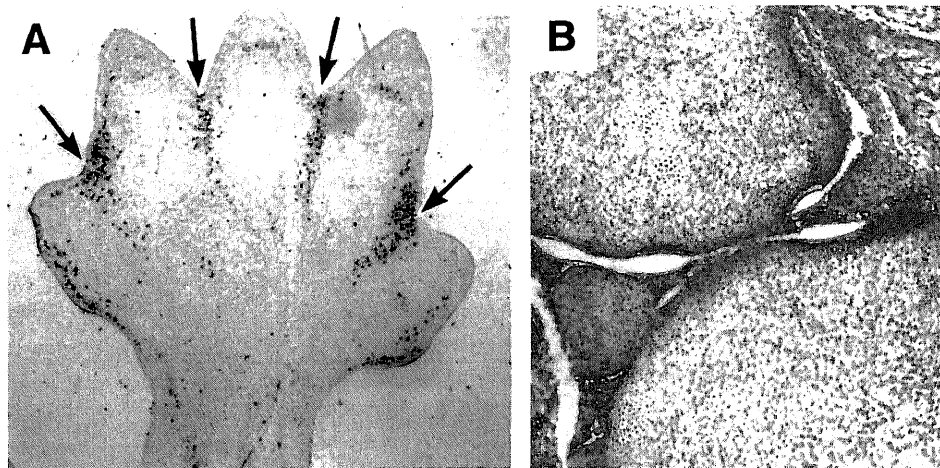


Fig. 13. Results of TUNEL method. (A) A section of a hand at E16 (control). Positive cells can be seen in the interdigital areas (arrows). (B) A sagittal section in the knee joint at E18. No positive cells are observed in the knee joint at stages from E16 to E18.5.

に扁平化しており、その細胞集団の中に、核が濃染する細胞が混在しているのが認められた (図3A)。これらの細胞はAbu-Hijleh¹⁹⁾らによって報告された暗細胞 (dark cell) に相当すると考えられ、本研究ではこれらの細胞を暗細胞と呼ぶことにする。本ステージにおけるIMZはさらに薄い層となっていたが、細胞密度についてはE16で観察されたときよりも高くなっていた。この時期において特筆すべき点として、エポキシ樹脂包埋切片における観察 (図3A) では関節腔の形成が未だ認められないが、パラフィン包埋切片 (図3B) においては関節腔の形成が開始した像が認められた。図3Bに示すように、パラフィン包埋切片においては内・外側半月の原基がこの時期から認められるようになり、半数の標本においてこれらの半月板と大腿骨との間に関節腔の形成が認められた (図3B)。さらに、この裂隙を強拡大にして観察すると、その内部に不整形を呈する細胞が少数ながら残存しているのが認められた (図3C)。

E17：パラフィン包埋切片においては、関節腔が拡大していた (図4A)。しかしながら、本ステージにおいてもE16.5の所見と同様に、エポキシ樹脂包埋切片では、未だ関節腔の形成は認められなかった (図4B)。IMZでは細胞の扁平化がさらに進行し、IMZにおける暗細胞はE16.5よりも数が増加していた (図4B)。

E17.5：パラフィン包埋切片において、大腿骨内側顆と内側半月との間では5例中4例に、また大腿骨外側顆と外側半月との間では5例全例に関節腔が認められた。さらにこの時期には、脛骨内側顆と内側半月との間で5例中2例に、また脛骨外側顆と外側半月との間で5例中1例に関節腔が認められた (図5)。しかしながら、エポキシ樹脂包埋切片における観察では、依然として関節腔を意味する構造は認められなかった。E17においてIMZで多数観察された暗細胞は、このステージでは著しく減少しており、各切片において1個だけが観察されるか、もしくは皆無であった。

E18：パラフィン包埋切片では、脛骨・半月板間における関節腔が全例 (4例中4例) で観察された。しかしながら、エポキシ樹脂包埋切片においては関節腔の形成は全く認められな

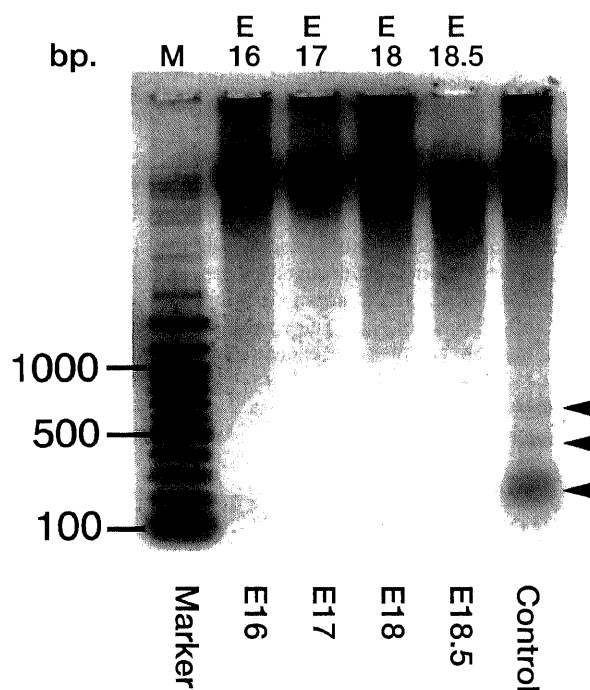


Fig. 14. Electrophoretic assessment for nuclear DNA fragmentation of knee joint at E16, E 17, E18, and E18.5. The hands at E16 are adopted as a control. A ladder pattern (arrowheads) characterized as apoptosis is found only in the control, but not in specimens of the knees.

かった。

E18.5：エポキシ樹脂包埋切片での観察において、はじめて関節腔が確認された (図6)。関節腔の形成は、まずIMZの周縁部で、関節半月と大腿骨ならびに脛骨との間に観察された。この時期のIMZには、扁平化が進んで紡錘形となった細胞が、その長軸を関節面に平行させながらほぼ2層の列をなして並んで

いた (図6)。

E19：パラフィン包埋切片 (6例) ならびにエポキシ樹脂包埋切片 (4例) の全例において、内・外側半月と大腿骨および脛骨との間に関節腔の形成が確認された (図7)。

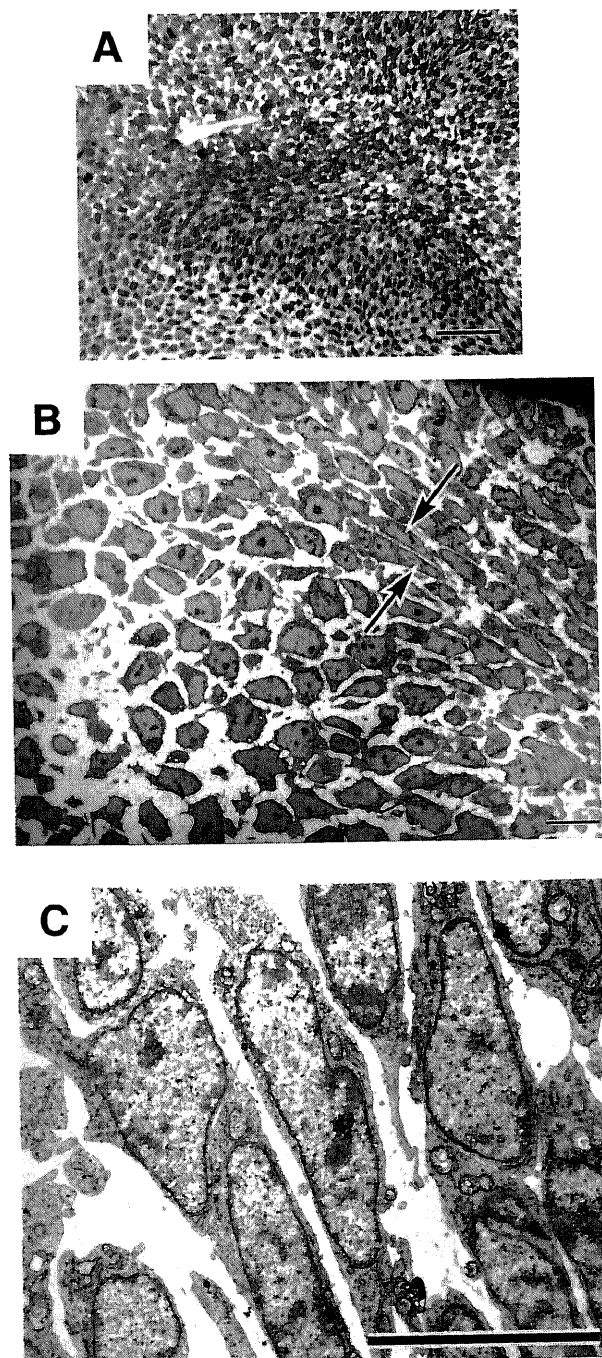


Fig. 15. Photographs of mesenchymal condensation in presumptive region of the anterior crucial ligament (ACL) at E17. (A) The presumptive ACL condensation was observed. Epoxy section. Toluidine blue staining. Bar, $100\mu\text{m}$. (B) Electron micrograph indicating presumptive ACL region. Comparatively flattened mesenchymal cells (arrows) were observed. Bar, $10\mu\text{m}$. (C) Magnified image of (B). The mesenchymal cells are scant in rER. Collagen fibrils in this condensation were scanty distributed in interstitial substance. Bar, $10\mu\text{m}$.

P1：エポキシ樹脂包埋切片による観察で、関節腔が拡大し関節構造が完成したことが確認された。

2) 透過型電子顕微鏡所見

本研究では、外層およびIMZにおける細胞形態の変化に焦点をあて、これらの部位におけるアポトーシスの有無について微小形態学的観点から解析を行った。各ステージにおける観察結果は以下の通りであった。

E16.5：外層に存在する未分化間葉細胞は、おおむね円形を呈していたが、細胞表面からは細胞間相互作用を推測させる突起が少数ではあるが出されていた (図8A)。しかし、本研究では突起同士が接合している像は認められなかった。細胞核は不整円形であった。細胞質において粗面小胞体はあまり発達しておらず、ミトコンドリアではクリスタが未発達で全体が円形に膨張していた。

IMZに存在する未分化間葉細胞は、細胞の外形、細胞核ともに扁平な楕円形を呈していた (図8B)。これらの細胞は、その長軸が関節面に対して平行になるように配列していた。細胞内小器官については、先述の外層に存在する未分化間葉細胞のそれに類似していた。細胞表面からは小突起が出ており、細胞間で互いに接合し、細胞間相互作用を起こしていると考えられる像が認められた (図8B)。コラーゲン線維は外層およびIMZのいずれにおいても網状に配列していたが、IMZにおいては、関

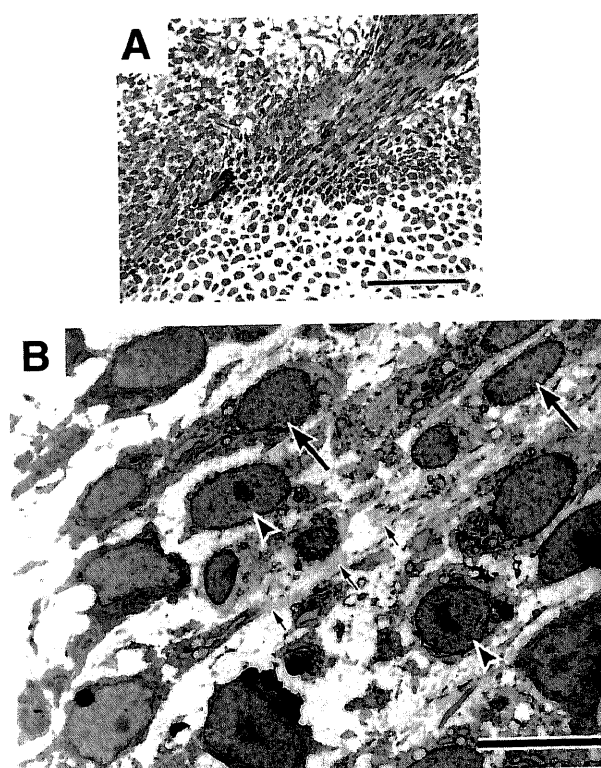


Fig. 16. E18.5. (A) Epoxy section of the presumptive ACL area. The area has become definite. Toluidine blue staining. Bar, $100\mu\text{m}$. (B) Electron micrograph of enthesis. Flattened cells (large arrows), which became rich in rER at this stage, and rounded cells (arrow heads) were mingled with each other at the enthesis. These cells were arranged parallel to the long axis of the ACL. A small amount of collagen fibrils arranged parallel to the axis was also observed at the enthesis (small arrows) and in the ACL itself. Bar, $10\mu\text{m}$.

節面に対して平行に配列する傾向が認められた (図8C, D). コラーゲン線維の密度はIMZよりも外層の方が高かった.

E17: IMZに存在する扁平な細胞の核において, 種々の程度のクロマチン凝集が認められた (図9A, B). これらのクロマチン凝集を有する細胞は, 光学顕微鏡で観察された暗細胞に相当すると考えられるが, この扁平な細胞のクロマチン凝集様式は, アポトーシスにおいて認められる凝集形態とは異なっていた. すなわち, アポトーシスでは核内のクロマチンは三日月型を呈して核膜内面に付着するように凝集するが, IMZの細胞では図9A, Bが示すように凝集クロマチンが核内全体に分散していた. さらに, 細胞縮小, 小空胞 (blebbing), アポトーシス小体の出現, マクロファージなどによるアポトーシス小体の貪食, リソソームの増加といったアポトーシスに典型的な所見は全く確認されなかった.

E17.5: 外層において, IMZとの境界に接する部分の細胞では, 円形細胞と扁平細胞とが混在しており, 円形細胞については軟骨芽細胞に類似した形態を呈していた (図10A). IMZの細胞では, さらなる扁平化の進行とともに, 細胞質の減少が認められた. また, 一部の細胞においては細胞質に空胞形成が認められた (図10B). コラーゲン線維は外層において直径ならびに密度の増加が顕著に認められた. しかしながら, IMZにおいてはコラーゲン線維の直径の増加は認められたものの, 密度に関してはE16.5 (図8D) で観察されたものとあまり差異はなかった (図10B, C).

E18: IMZにおいて一部の細胞に空胞化がみられた. 外層, IMZ共に, E17.5と同様に細胞間基質の増加が認められた.

E18.5: IMZの周縁部において関節腔の形成が確認された (図11). 強拡大にして観察したところ, 関節腔の壁面をなす細胞外基質は未発達で, 関節腔と周囲構造物との境界は不明瞭であった (図11). IMZの細胞は扁平化が進行し紡錘形を呈するようになっていた. これらの紡錘形細胞においては細胞質の減少が認められたものの, 空胞形成やクロマチン凝集などの像は認められなかった. 半月板や骨端の表面では細胞が薄層をなしていた.

E19: 関節腔の形成が進み, 完成した, 成獣において通常認められる関節構造と同様に表層から深層にかけて, 紡錘形細胞の薄層よりなる表層 (tangential zone), 軟骨細胞で構成される中層 (transitional zone), 骨組織よりなる深層 (radial zone) が認められるようになった (図12).

P1: E19と比較し大きな変化は認められず, ほぼ同様の所見が得られた.

3) TUNEL法を用いた膝関節腔の形成過程におけるアポトーシスの解析

E16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5の膝関節細胞において, TUNEL法によりアポトーシスの解析を行ったところ, これらすべての標本においてTUNEL陽性細胞は確認されなかった. 一方, 対照群の前肢指間部 (E16) では多数のTUNEL陽性細胞が認められた (図13).

4) 電気泳動法を用いた膝関節腔の形成過程におけるアポトーシスの解析

E16, E17, E18, E18.5の膝関節細胞において, アポトーシス特有のDNA断片のラダーパターンは確認されなかった. 対照群前肢 (E16) ではDNA断片のラダーパターンが確認された (図14).

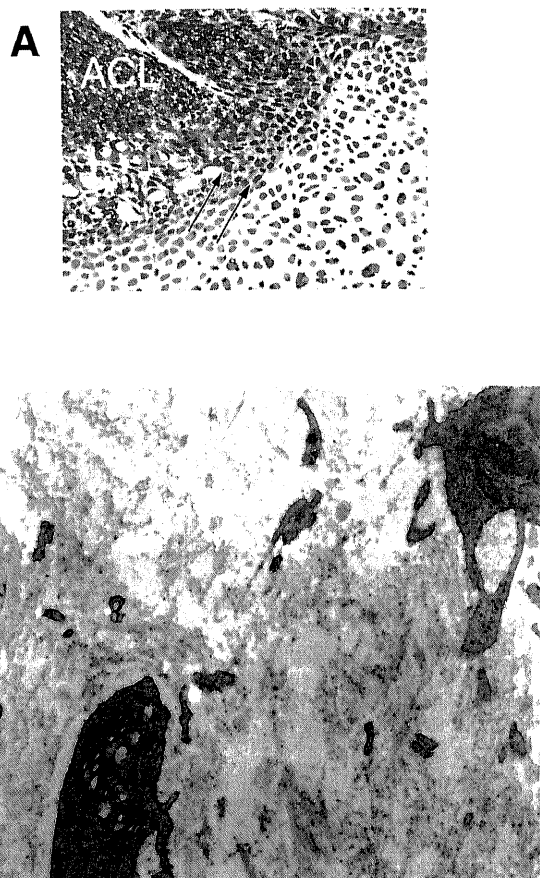


Fig. 17. E19. (A) Epoxy section of ACL and enthesis. Arrows indicate the part of the enthesis which is investigated by electron microscope in (B). Toluidine blue staining. Bar, 100 μ m. (B) Electron micrograph of enthesis. Collagen fibrils in the net-like distribution increased in the enthesis, though those in the parallel arrangement did not increase (asterisk). Bar, 1 μ m.

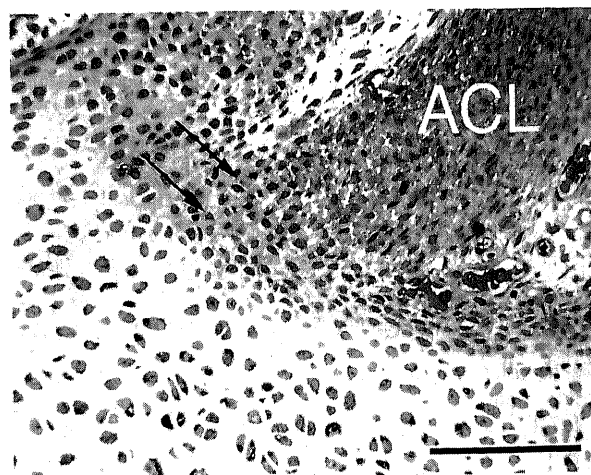


Fig. 18. Epoxy section of ACL and enthesis at P1. The number of flattened cells decreased and rounded cells became dominant at the enthesis, and the cell density was slightly decreased (arrows). Toluidine blue staining. Bar, 100 μ m.

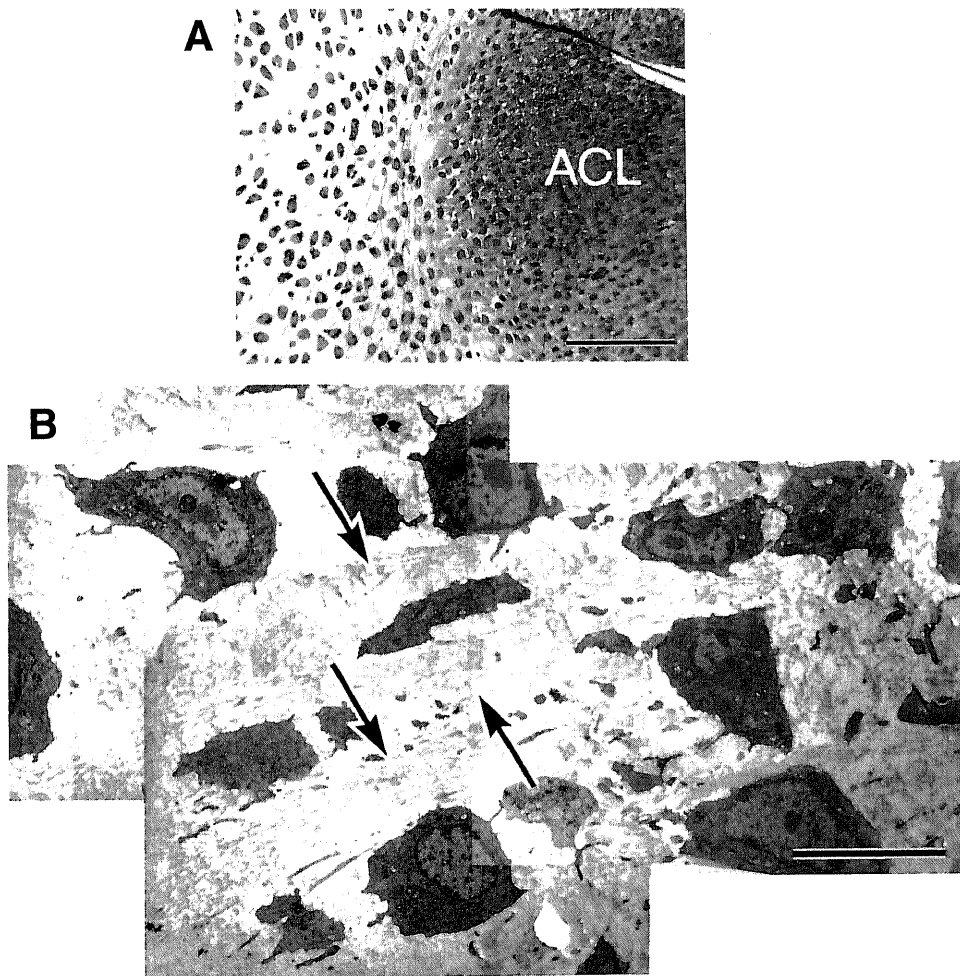


Fig. 19. Photographs of ACL and enthesis at P2. (A) Epoxy section. Toluidine blue staining. Bar, $100\mu\text{m}$. (B) Electron micrograph indicating the arrangement of the collagen fibrils at the enthesis. Collagen fibrils in parallel arrangement (arrows) also developed conspicuously, where two or three rounded cells were longitudinally disposed between bunches of these fibrils. Bar, $10\mu\text{m}$.

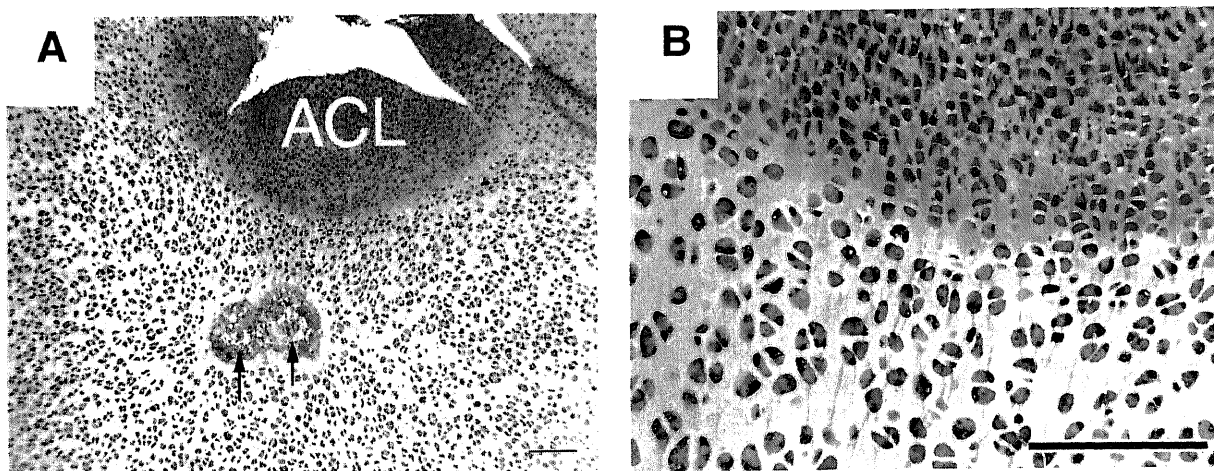


Fig. 20. Photographs of epoxy sections at P6. Toluidine blue staining. (A) Vascular formation (arrows) started in the epiphyseal cartilage adjacent to the enthesis. Bar, $100\mu\text{m}$. (B) The number of disposing cells increased up to about 6 at the enthesis and they became columnar formation. While this formation was not observed in the other presumptive subchondral bone area. Collagen fibrils at the enthesis developed to make the formation clear. Bar, $100\mu\text{m}$.

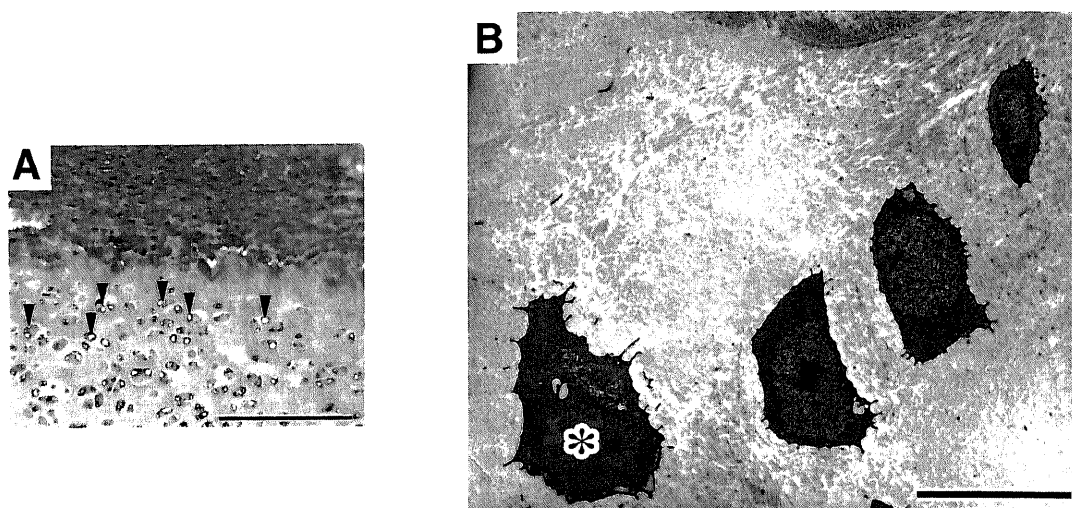


Fig. 21. Photographs of enthesis at P10. (A) Vacuolation was observed in cytoplasm of the rounded cells in the deeper part of the enthesis (arrowheads). Epoxy section. Toluidine blue staining. Bar, $100\mu\text{m}$. (B) Electron micrograph of the deeper part of the enthesis. Chondrocytes (asterisk) neighboring the enthesis began to degenerate. Bar, $10\mu\text{m}$.

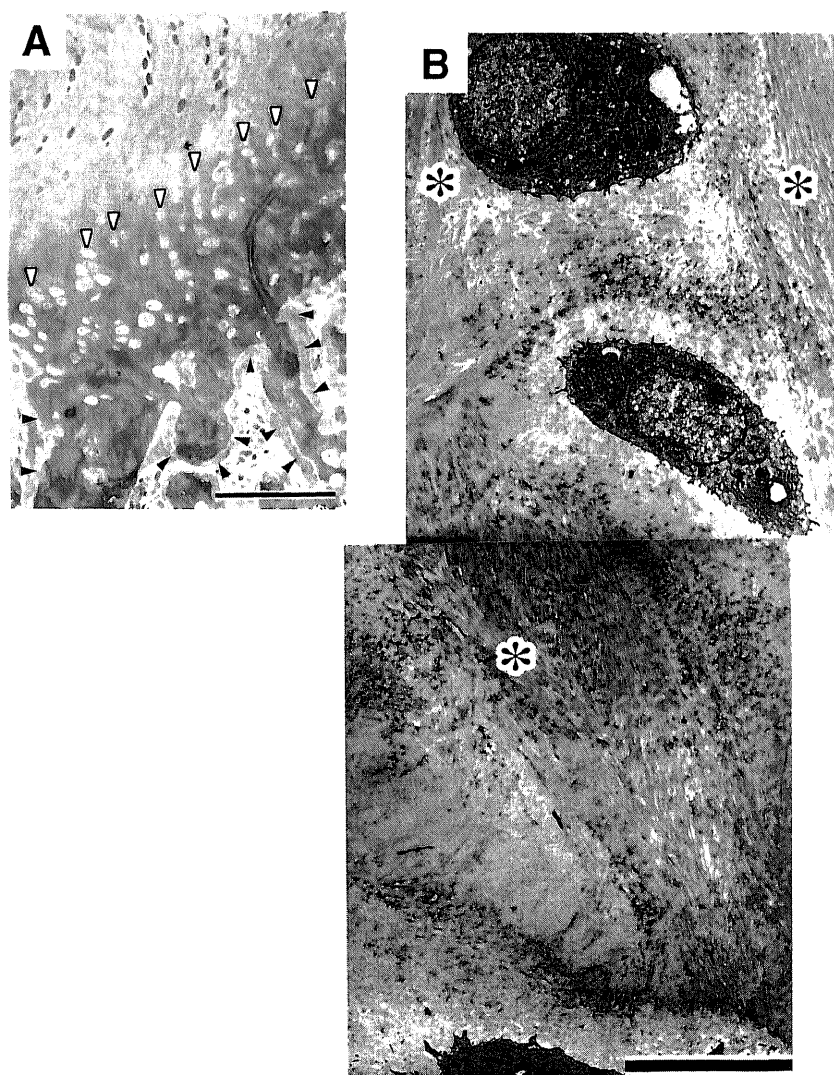


Fig. 22. P30. (a) Ossification (black arrowheads) was observed in the epiphysis. Chondrocytes in a column at the enthesis had started in degeneration (white arrowheads). Epoxy section. Toluidine blue staining. Bar, $100\mu\text{m}$. (b) Electron micrograph of the enthesis. Collagen fibrils in the parallel arrangement (asterisks) at the enthesis had developed and spread extensively to the epiphysis. Bar, $10\mu\text{m}$.

2. 靭帯と靭帯付着部の形成

1) 光学顕微鏡および電子顕微鏡所見

E17：前十字靭帯が形成される領域において、粗面小胞体の発達していない扁平な間葉細胞の集積が確認され (図15A, B)、細胞集積部や靭帯と靭帯付着部のコラーゲン線維は軟骨原基骨端部の網目状コラーゲン線維に比べると疎で、発達の場合が低かった (図15C)。靭帯と靭帯付着部には、靭帯実質部の扁平な細胞とは異なる大型の間葉細胞が存在していた。

E18：前十字靭帯や靭帯と靭帯付着部におけるコラーゲン線維は網目状に発達し、骨端部のコラーゲン線維の配列と大差は無くなっていた。

E18.5：靭帯と靭帯付着部において、粗面小胞体の発達した扁平な細胞と円形の間葉細胞の混在細胞群が靭帯の走行に一致して存在することが確認された (図16A)。また靭帯実質にある扁平な細胞においても粗面小胞体が発達していた。コラーゲン線維は靭帯の走行に沿って出現し始め、靭帯と靭帯付着部にも

同様の走行のコラーゲン線維が部分的に確認された (図16B)。

E19：靭帯のコラーゲン線維は増加した (図17A)。靭帯と靭帯付着部においても靭帯の走行に一致して、骨端部に向かうコラーゲン線維が増加していた (図17B)。同部位ではE18.5と同様に、扁平な細胞と円形な細胞が混在していた。

P1：靭帯と靭帯付着部では扁平な細胞が少なくなり、円形細胞が大部分を占める様になった (図18)。

P2：この時期では靭帯の走行に一致し、靭帯と靭帯付着部を走行するコラーゲン線維がさらに増え、それに挟まれて円形の細胞が長軸方向に2,3個が並んだ構造を呈するようになった (図19A, B)。他の部位にはこのような細胞配列は確認されなかった。

P6：脛骨骨端部に初めて血管が確認された (図20A)。靭帯と靭帯付着部に観察される円形細胞は軟骨細胞様となり、長軸方向への配列は4,5個に数を増し、柱状配列を呈する様になった。しかし、将来軟骨下骨になる部分にはこのような配列は確認さ

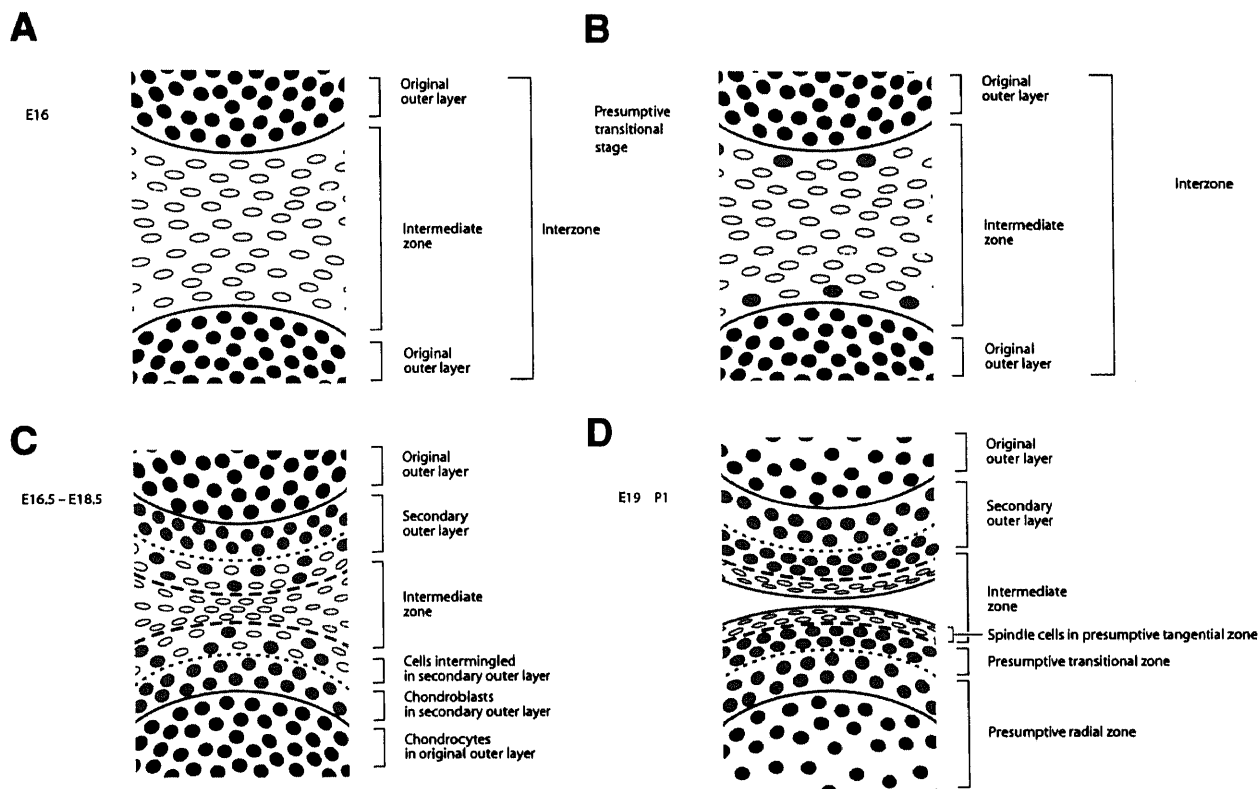


Fig. 23. Schematic representation of cellular and strata changes in IZ. (a) IZ consists of two original outer layers (blue) and the intermediate zone (yellow; between the red solid lines). (b) The presumptive transitional stage. Cells of original outer layer start to become mature chondroblasts. In the intermediate zone, several cells adjacent to the original outer layers transform into chondroblasts (indicated by red circle). (c) Cells exhibit elongation, vacuolization and/or pyknosis in the intermediate zone. Many cells of intermediate zone transform into chondroblasts, which formed the secondary outer layer. According to the increase of the chondrocytes, the intermediate zone seemingly narrows due to the decrease of elongated cells. In the inner part of the secondary outer layer, the elongated cells and chondroblasts are intermingled with each other. Cells of original outer layer have already become mature chondrocytes. (d) The cells in the most central part of the intermediate zone are further elongated to become spindle cells. These cells are finally deposited in two strata in the central part of the joint. Then cavitation occurs between them. The lining spindle cells can be thought to correspond to those in the tangential zone of the adult articular cartilage. The superficial area of the secondary outer layer seems to be homologous to the transitional zone because the cellular constitutions are similar to each other. The cells in the original outer layer and the deeper part of the secondary outer layer are almost mature chondrocytes after E16.5, and have formed the epiphysis. Thus, they are usually speculated to be ossified, and we think it is reasonable to assign them to the radial zone or cartilaginous primordium, both of which are finally ossified.

れなかった (図20B)。

P10: 2骨 (大腿骨と脛骨) 端部の血管周囲には、骨化に関係する軟骨細胞の細胞質破壊像が観察された (図21A, B)。軟骨様円形細胞で形成する靭帯と靭帯付着部の柱状配列は、靭帯実質部にむけて列内の細胞数を増やしていた。

P30: 靭帯と靭帯付着部の軟骨様円形細胞は成熟して大きな軟骨細胞となり、これまでのような明瞭な柱状構造を呈さなくなった (図22A)。そして細胞密度は他の関節軟骨や骨端部に比べると疎になっていた。また靭帯方向に沿ったコラーゲン線維はさらに発達し、骨端部へ樹状に広がっていた (図22B)。

考 察

1. 関節腔の形成におけるアポトーシスの関与

膝関節の発生過程において、IZにクロマチン凝集がみられる扁平な細胞の存在が報告されている⁹⁾。Abu-Hijlehら¹⁹⁾はニトリ胚を用いた膝関節の発生学的研究で同様な細胞の存在を確認し、これを暗細胞 (dark cell) と称した。さらに、Abu-Hijlehら¹⁹⁾は、暗細胞がアポトーシスを起こした細胞にみられる特有の形態変化を示していたと述べている。O'Rahillyら³¹⁾は、これらのクロマチン凝集を起こした扁平細胞の存在を認めているが、122例中2例においてのみ確認され、しかも数が非常に少なかったと報告している。しかしながら、本研究においては暗細胞がIMZにおいてE16.5からE17.5にかけて認められ、E17においては数多くの暗細胞が認められた。この相異はO'Rahillyら³¹⁾が検索した標本のステージに原因があると考えられる。これらの暗細胞の形態的特徴を光学顕微鏡レベルで精査したところ、アポトーシスを起こした細胞とは全く異なることが明らかとなった。また、電子顕微鏡の所見においてもアポトーシスに特有な形態である細胞縮小、小空胞、アポトーシス小体の出現、マクロファージなどによるアポトーシス小体の貪食、リボソームの増加は確認されなかった。それ故、これらの暗細胞はアポトーシスの一段階を示すものではないと考えられる。

アポトーシスの生化学的な検出法として、電気泳動法によるDNA断片化の観察が報告されている^{32)~34)}。また、TUNEL法によって、DNA断片化を免疫組織化学的に同定することが可能である²⁸⁾。本研究においても、これらの方法を用いてアポトーシスの検出を試みたが、いずれの方法においてもアポトーシスを証する所見は得られなかった。以上より、形態学的、生化学的、免疫組織化学的に検索したが、膝関節腔の形成過程においては、アポトーシスが関与する可能性は極めて低いと結論づけられる。

2. IZの細胞形態と層構造の変化

膝関節腔の形成において、アポトーシスが関与する可能性は低いということを前述したが、このことはIZの細胞は消失せずに、関節の構成要素になるということを示している。本研究において、IMZにおける扁平な細胞の層数が減少することが確認された。この減少はIMZの両端の層 (外層に接する部分) の細胞が徐々に外層に組み込まれた可能性があることを示唆している。すなわち、IMZの両端の層にある扁平な細胞が、細胞質の空胞化・核濃縮を呈した状態から、外層でみられたような円形の細胞へと形態変化を起こすのではないかと仮説が立てられる。この仮説を支持するものとして、E17.5において外層とIMZとが接する位置に扁平な細胞と軟骨芽細胞とが混在した状態で観察された (図10A)。従って、外層には実質的に2つの

層、すなわち本来の外層 (original outer layer) とIMZの扁平な細胞由来の二次的外層 (secondary outer layer) が存在することが推測される。

本研究の所見をもとに、E14~P1までのラット膝関節腔の形成過程をまとめると以下ようになる (図23参照)。E16のIMZには5層以上の低度の扁平な細胞の層が認められる。IMZにおいて本来の外層に接する部分の扁平な細胞が、E16とE16.5で円形の細胞へと形態変化を起こし二次的外層を形成する (図23B, C)。IMZの扁平な細胞は二次的外層の形成に使われるため、数が減少し見掛け上IMZは次第に薄くなる。E17.5では、IMZの細胞数がさらに減少し、残った細胞は扁平化が進む。E18.5においてIMZに残った扁平な細胞は空胞化と核濃縮を減少させ紡錘形の細胞 (spindle cell) となる。そして紡錘細胞間で、関節腔が形成される。E19において紡錘細胞は関節軟骨の表層に並ぶ。

成人の関節軟骨は表層 (tangential zone)、中層 (transitional zone)、深層 (radial zone) の3層に区別される。E19からP1で表層では紡錘細胞を含む様になり、中層では成熟した軟骨細胞が観察されることから形態学的に表層と中層は区別可能となる。関節軟骨3層構造における細胞の形態学的変化は以下のとおりである。IZにおける本来の外層の細胞は骨端の軟骨細胞となる。IMZから派生した二次的外層の細胞は中層の関節軟骨を形成する。最後に残ったIMZの細胞は、紡錘細胞となり関節軟骨の表面や半月板表面に配列する。

3. 関節腔の形成の開始時期および開始部位

本研究の結果では、関節腔の形成の開始時期がパラフィン包埋切片ではE16.5、エポキシ樹脂包埋切片ではE18.5となっており、それぞれの標本で関節腔の形成時期が異なっていた。また、関節腔の形成の開始部位については、パラフィン包埋切片では関節腔の形成は半月と大腿骨との間から開始しているという所見が得られた。その一方で、エポキシ樹脂包埋切片では、半月大腿部と半月脛骨部において関節腔の形成がほぼ同時期に開始していた。

Mitrovic¹⁷⁾は、関節腔の形成はE16頃に開始すると報告している。このことは、パラフィン包埋切片でE16.5に関節腔の形成の開始が認められたという我々の所見とほぼ一致している。しかしながら、関節腔に面した細胞外基質の表面を精査すると、その表面は不整であり、幾つかの細胞が関節腔に剥げ落ちるように残存しているのが認められた。一方、エポキシ樹脂包埋切片における電子顕微鏡による所見では、E19でみられた関節腔は紡錘細胞の間で形成され、その表面の基質は整っていた。それ故、パラフィン包埋切片で認められるE16.5の関節腔と思われる構造物はパラフィンの伸展によって組織の力学的脆弱部が破壊したことによるものであると推測される。したがって、真の関節腔の形成の開始時機はE16もしくはE16.5ではなく、むしろE18.5に近いものと考えられる。パラフィンとエポキシ樹脂という包埋物質の特性の差による所見の相違は、ヒトの他の組織材料でも引き起こされているという³¹⁾。E16.5においてIMZで確認される細胞は楕円形を呈しており、E18.5には紡錘形細胞となり、その後の発生過程においてはあまり変化がなかった。これらの紡錘形細胞は、一般に完成した関節の表層において認められることから、紡錘形細胞の出現は関節構造の完成の指標の一つになると考えられる。すなわち、関節腔の形成は関節構造形成の全過程の中で最終段階に確立することを示している。

関節腔のどの部分が最初に形成されるかということについては、ヒトやニワトリにおいて、内側大腿脛骨関節から形成される^{35)~37)}という報告や、ヒトでは最初に大腿半月部に腔形成が見られる¹¹⁾³⁸⁾という報告がある。また、関節腔の形成は関節の辺縁から始まるとあるが³⁹⁾、Andersenら¹⁰⁾は、この所見はartifactであると述べている。このように、関節腔の形成の初発部位に関しては、過去の文献において統一した見解が得られていないのが現状である。本研究では、パラフィン包埋切片において最初の関節腔の形成はIMZの辺縁部で大腿半月部に見られた。一方、エポキシ樹脂包埋切片において、腔形成の始まる部位はIZの周縁で、大腿半月部と脛骨半月部とで同頻度で認められた。パラフィン包埋方法に比して、エポキシ樹脂包埋の方が人為構造が少ないという定説に依拠すると、膝関節腔の形成はIMZの周縁で、大腿半月部と脛骨半月部において同時に開始されるものと考えられる。

4. 関節腔の形成メカニズム

関節腔形成のメカニズムについては、IZの細胞間基質においてプロテオグリカンとコラーゲン線維が減少し、その部位にヒアルロン酸が分泌・蓄積され、そしてヒアルロン酸の膨張圧が組織を分けることによって関節腔形成が促進されるという報告がある^{40)~43)}。

関節腔形成予定領域の細胞において、UDP グルコースー脱水素酵素 (uridine diphosphoglucose dehydrogenase, UDPGD) 活性が増加し、ヒアルロン酸合成酵素関連タンパク (hyaluronan synthase associated protein, HAS-AP) の産生およびヒアルロン酸合成酵素 (hyaluronan synthase, HAS) の活性が増加する事⁴⁰⁾⁴¹⁾が報告されている。このとき、IZにおけるUDPGDおよびHAS活性は、関節腔が形成される以前に増加することから⁴²⁾、ヒアルロン酸とその関連物質が、関節腔形成メカニズムに深く関与していると考えられている。Dowthwaiteら⁴³⁾は、CD44を含むヒアルロン酸結合タンパクに対するオリゴ糖ブロッカーを用いたヒアルロン酸の競合阻害実験で、関節腔形成が著しく阻害されたと報告している。それゆえDowthwaiteら⁴³⁾は、関節腔形成過程においてヒアルロン酸が非常に重要な役割を果たしていると結論づけている。ヒアルロン酸は細胞膜で産生され、細胞外基質に直接放出されるため、本研究でIMZの扁平な細胞にも認められたように、粗面小胞体が著しく空胞化した場合でも、ヒアルロン酸の産生は阻害されることはない⁴⁴⁾。本研究で見られた空胞化は、コラーゲン線維やプロテオグリカンのコア蛋白の産生低下に関連したものであると考えられる。ニワトリにおいては、関節腔形成に先行してIZにヒアルロン酸の産生が増加するが、その際、コラーゲン線維の減少も同時に起こると報告されている⁴⁵⁾。すなわち、関節腔が形成されるところでは、ヒアルロン酸の膨張圧が高まり、コラーゲン線維の減少により力学的に脆弱となるものと考えられる。本研究においても、関節腔形成時期のIMZにおいては、コラーゲン線維の密度が疎であることから、関節腔がヒアルロン酸の膨張圧によって形成されるという説は妥当であると考えられる。

5. 靭帯付着部の形成

腱と靭帯が骨に付着する方式としては、靭帯が線維軟骨を介して長幹骨の骨端もしくは骨突起に付着する線維軟骨性付着と、骨膜などの線維性構造物を介して骨幹端、もしくは骨幹に付着する線維性付着とがある^{46)~50)}。膝内側々副靭帯は大腿骨

の骨端に対しては線維軟骨性に付着し、脛骨の骨幹端に線維性に付着する⁵⁰⁾。靭帯の骨付着部の細部構造に関しては、靭帯と骨との間に存在するSharpey線維が重要な働きをしているといわれている^{51)~54)}。

今回の膝前十字靭帯脛骨側付着部の発生段階における形態観察においては、軟骨膜は形成されず、関節腔形成時に境界を示すと考えられる紡錘形細胞による層構造は観察されなかった。また靭帯走行に沿ったコラーゲン線維束の軟骨内での発達とそれに挟まれた円形細胞 (P6以後の軟骨様細胞) の柱状配列の段階的变化が観察された。このことは、前十字靭帯脛骨側付着部におけるコラーゲン線維の発達は、線維が二次的に骨膜を介して骨に結合するというシャーピー線維の発達とは異なる可能性を示唆していると考えられる。

結 論

White Wister種ラット126膝を用いて膝関節腔形態形成を観察し、その機序にapoptosisが関与しているかを調査した。その結果、以下の結論を得た。

1. 関節腔の形成機序においてTUNEL法、DNA電気泳動による研究でアポトーシスの関与は確認されなかった。
2. IMZにおいて扁平な細胞の層数が減少するのは、これらの扁平細胞の一部が細胞質の空胞化と核濃染を示した状態から円形に細胞形態を変化させ、外層に組み込まれることが原因であると考えられる。
3. 関節腔の形成の開始はパラフィン切片ではE16.5、エポキシ樹脂切片ではE18.5において観察されたが、両者における人為的構造の度合に依拠すると、後者がより正確に示していると考えられる。
4. 関節腔形成時期のIMZにおいてはコラーゲン線維の密度が明白に疎であることからして、ヒアルロン酸の膨張圧によって関節腔が形成されるということが示唆される。
5. 膝前十字靭帯の脛骨への付着部の発生に関しては、靭帯付着部のコラーゲン線維はシャーピー線維の発達と異なる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご検閲を賜りました恩師田中重徳教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究中、常に御助言を賜りました札幌医科大学整形外科教授石井清一教授に深く感謝申し上げます。さらに、本研究の遂行にあたりご協力を頂きました金沢大学医学部神経分布路形態・形成学講座の方々に厚く御礼申し上げます。

なお、本研究の要旨は第105会日本解剖学会総会ならびに第15回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。

文 献

- 1) Walmsley R. The development of the patella. J Anat 74: 360-368, 1940
- 2) McDermott LJ. Development of the human knee joint. Arch Surg 46: 705-719, 1943
- 3) Haines RW. The development of joints. J Anat 81: 33-55, 1947
- 4) Haines RW. The early development of the femoro-tibial and tibio-fibular joints. J Anat 87: 192-206, 1953
- 5) Gardner E, Gray DJ, O'Rahilly R. The prenatal development of the skeleton and joints of the human foot. J Bone Joint Surg Am 41-A: 847-876, 1959

- 6) Gardner E, O'Rahilly R. The early development of the knee joint in staged human embryos. *J Anat* 102: 289-299, 1968
- 7) Merida-Velasco J, Sanchez-Montesions I, Espin-Ferra J, Merida-Velasco JR, Rodriguez-Vazquez JF, Jimenez-Collado J. Development of the Human knee joint ligament. *Anat Rec* 248: 259-268, 1997
- 8) Haines RW. Cartilage canals. *J Anat* 68: 45-64, 1933
- 9) Mitrovic D. Development of the diarthrodial joints in the rat embryo. *Am J Anat* 151: 475-486, 1978
- 10) Andersen H, Bro-Rasmussen F. Histochemical studies on the histogenesis of the joints in human fetuses with special reference to the development of joint cavities in the hand and foot. *Am J Anat* 108: 111-122, 1961
- 11) Finnegan MA, Uthoff HK. The development of the articular cartilage. In Uthoff HK (eds), *The Embryology of the Human Locomotion System*, p25-31. Springer-Verlag, Berlin, 1990
- 12) Whillis J. The development of synovial joints. *J Anat* 74: 277-283, 1940
- 13) Murray PDF, Drachman DB. The role of movement in the development of joints and the related structures: the head and neck in the chick embryo. *J Embry Exper Morph* 22: 349-371, 1969
- 14) Daskocil M. Formation of the femoropatellar part of the human knee joint. *Folia Morphol* 33: 38-47, 1985
- 15) Lelkes G. Experiments in vitro on the role of movement in the development of joints. *J Embry Exper Morphol* 6: 183-186, 1958
- 16) Huson A. Reconstruction du squelette des pieds d' un foetus humain de 11.5cm avec une malformation unilaterale du tarse. *Comptes rendus Association des Anatomistes* 53: 1013-1022, 1969
- 17) Mitrovic D. Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo: morphological, ultrastructural and histochemical studies. *Am J Anat* 150: 333-348, 1977
- 18) Nailin AM, Greenlee TK, Sandell LJ. Collagen gene expression during development of avian synovial joints: transient expression of type II and XI collagen genes in the joint capsule. *Dev Dyn* 203: 352-362, 1995
- 19) Abu-Hijleh G, Reid O, Scothorne RJ. Cell death in the developing chick knee joint. I. Spatial and temporal patterns. *Clin Anat* 10: 183-200, 1997
- 20) Hasty P, Bradly A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364: 501-504, 1993
- 21) Tone S, Tanaka S, Kato Y. The inhibitory effect of 5-bromodeoxyuridine on the programmed cell death in the chick limb. *Dev Growth Differ* 25: 381-391, 1983
- 22) Hurle JM. Cell death in developing systems. *Methods and Ach Exper Pathology* 13: 55-86, 1988
- 23) Burek MJ, Oppenheim RW. Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6: 427-446, 1996
- 24) Mori C, Nakamura N, Okamoto Y, Osawa M, Shiota K. Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labeling of DNA fragmentation. *Anat Embryol* 190: 21-28, 1994
- 25) Sanders EJ, Wride MA. Program cell death in development. *Int Rev Cytol* 163: 105-173, 1995
- 26) Dawd DS, Hinchliff JR. Cell death in the "opaque patch" in the central mesenchyme of the developing chick limb: a cytological, cytochemical and electron microscopic analysis. *J Embry Exper Morphol* 26: 401-424, 1971
- 27) Wallis MA, Griffin RL. A routine method for embedding animal tissues in Spurr resin for electron microscopy. *J Clin Pathol* 26: 77-78, 1973
- 28) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 29) Mori C, Nakanura N, Kimura S, Irie H, Takagi T, Shiota K. Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat Rec* 242: 103-110, 1995
- 30) Tone S, Tanaka S, Minatogawa Y, Kido R. DNA fragmentation during the programmed cell death in the chick limb buds. *Exper Cell Res* 215: 234-236, 1994
- 31) O'Rahilly R, Gardner E. The development of the knee joint of the chick and its correlation with embryonic staging. *J Morphol* 98: 49-87, 1956
- 32) Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136: 593-608, 1990
- 33) McConkey DJ, Orrenius S, Jondal M. Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol Today* 11: 120-121, 1990
- 34) Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 11: 105-119, 1992
- 35) Gray DJ, Gardner E. Prenatal development of the human knee and superior tibiofibular joints. *Am J Anat* 86: 235-288, 1950
- 36) Palacios J, Rhode M. Embriologia de la rodilla. In Guillen P (eds), *IV Symposium Internacional de Traumatologia* (ed. Guillen P), p3-25, Fundacion Mapfre, Madrid, 1980
- 37) O'Rahilly R. The development of the synovial joints in the chick. *Anat Rec* 112: 303-375, 1952
- 38) Hesser C. Beitrag zur kenntnis der Gelenkentwicklung beim Menschen. *Morphologisches Jahrbuch* 55: 489-567, 1926
- 39) Faldino G. Ricerche sulla sviluppo delle articolazioni. *Chirurgia delgi Organi di Movimento* 5: 609-651, 1921
- 40) Prehm P, Mausolf A. Isolation of streptococcal hyaluronate synthase. *Biochem J* 235: 887-889, 1986
- 41) Mehdizadeh S, Bitensky L, Chayen J. The assay of uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity: discrimination from xanthine dehydrogenase activity. *Cell Biochem Funct* 9: 103-110, 1991
- 42) Pitsillides AA, Archer CW, Prehm P, Bayliss MT, Edwards JCW. Alterations in hyaluronan synthesis during developing joint cavitation. *J Histochem Cytochem* 43: 263-273, 1995
- 43) Dowthwaite GP, Edwards JCW, Pitsillides AA. An essential

role for the interaction between Hyaluronan and Hyaluronan binding proteins during joint development. *J Histochem Cytochem* 46: 641-651, 1998

44) Prehm P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J* 220: 597-600, 1984

45) Craig FM, Bently G, Archer CW. The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratan sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint. *Development* 99: 383-391, 1987

46) Shineider H. Zur Struktur der Sehnenansatzzonen. *Zeitschrift fur Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 119:431-456, 1956

47) Dolgo-Saburoff B. Uber Ursprung und Insertion der Skelettmuskeln. *Anat Anz* 68: 80-87, 1929

48) Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments-an adaption to compressive load. *J Anat* 193: 481-494, 1988

49) Gao J, Messner K. Quantitative comparison of soft tissue-bone interface at chondral ligament insertions in the rabbit knee joint. *J Aant* 188: 367-373, 1996

50) Gao J, Messner K, Palphs JR, Benjamin M. An immunohistochemical study of entheses development in the medial collateral ligament of the rat knee joint. *Anat Embryol* 194: 399-406, 1996

51) Sharpey W, Ellis GV. The ligament attachment. *In* Jones Quain (eds), *Element of Anatomy*, p125-127, Walton and Moberly, London, 1856

52) Stillwell DJ, Gray DJ. The microscopic structure of periosteum in areas of tendinous contact. *Anat Rec* 120: 663-677, 1954

53) Cooper RR, Misol S. Tendon and Ligament Insertion. *J Bone Joint Surg Am* : 1-20, 1970

54) 藤田恒夫. 総論. 標準組織学 (藤田尚男編), 第3版, 171頁, 医学書院, 東京, 1988

Mechanism of Formation of the Knee Joint Cavity and Crucial Ligaments in Rats: A Combined Morphological, Immunohistochemical and DNA Fragment Electrophoretic Study Masaaki Ito, Department of Anatomy and Neuroembryology, Division of Neuroscience, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med.Soc., **111**, 300 — 316 (2002)

Key words genual joint, cavitation, apoptosis, crucial ligament ,rat embryo

Abstract

The mechanism of development of the knee joint was studied in embryonic and postnatal rat bodies. Close attention was paid to clarify the process of cell differentiation and the possibility of involvement of apoptosis in the process of cell differentiation in this joint, using both light and electron microscopes, the TUNEL method and electrophoresis of DNA fragments. The articular or joint cavity was formed in an intermediate zone which occupied the center of interzone of the knee joint. However, no morphological or biochemical evidences in favor of the occurrence of apoptosis in the interzone of the joint have been obtained at any embryonic stages. In the intermediate zone, the extended cells were found to be arranged in several parallel layers. The cytoplasm of these cells was vacuolated, and the nuclei were densely stained. Some of the extended cells further flattened and developed into spindle cells, forming two layers. The remaining cells were integrated into the outer layer and changed to chondroblasts. Collagen fibers were arranged in a network in the outer layer, parallel with the extended cells in the intermediate zone. In addition, the density of collagen fibers was low in the intermediate zone. In paraffin-embedded sections, formation of the joint cavity seemed to start at E16.5. However, in resin-embedded sections which in this study were simultaneously prepared to reduce methodological artifacts, the lacunal spaces were confirmed between spindle cells at later stage, i.e., E18.5. These spindle cells were arranged on the surface of the meniscus and articular cartilage; they were found to differentiate at later stages to chondrocytes. Regarding the mechanism of the formation of articular cavities, it is conceived that the cavity forms due to the vulnerability of cell junctions from the reduction in proteoglycan and collagen fibers, and due to swelling of the vulnerable region by hyaluronic acid production. According to our observations, it is suggested that the minute morphological changes of cells in the interzone seem to reflect the changes of the arrangement and density of collagen fibers and the state of extracellular matrix between the layers. In addition, it is considered that the articular or joint cavity is formed in the matrix between spindle cells existing in the intermediate zone. Regarding the development of the entheses of the anterior crucial ligament on the tibia, the perichondrium was not formed in the region of the entheses, and the spindle cell layer structure which represented the boundary of the articular cavity was not ascertained in any of the specimens of embryos examined in this study. Collagen fiber bundles developed along with the ligament in the cartilage, and cylindrical arrangement of rounded cells (chondrocyte-like cells after P6) sandwiched by the collagen fibers and ligament changed stepwise. These findings suggest that the development of collagen fibers in the entheses of the anterior crucial ligament differs from that of Sharpey's fibers.